 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.07.05 J South Med Univ, 2016, 36(7): 904-908

基础研究

ApoE4在U87细胞中可增加GSK-3β的表达及Tau的磷酸化

何颜结[1,2],卫佩如[3],伍巧燕[1],张馨宇[3],张兴梅[1],刘晓加[2],王 方[1]
南方医科大学[1]基础医学院神经生物学教研室,[2]南方医院神经内科,[3]第一临床医学院,广东 广州 510515

摘要:目的 探讨ApoE4与GSK-3β及Tau蛋白超磷酸化之间的关系,为研究ApoE4在阿尔茨海默病(AD)中的作用机制提供实验依据。**方法** 分别将对照质粒载体pIRES-EGFP、重组质粒ApoE4/pIRES-EGFP和ApoE3/pIRES-EGFP转染U87脑星形胶质细胞系,用免疫蛋白印迹法(Western blotting)检测p-Tau/Tau及GSK-3β蛋白水平的变化。在U87细胞中转入干扰ApoE表达的siRNA(ApoE-siRNA)及对照siRNA,检测p-Tau/Tau及GSK-3β蛋白的改变情况。将质粒转染前后及siRNA干扰前后目标蛋白的含量或磷酸化水平的改变进行统计学比较。**结果** 与对照组相比,GSK-3β蛋白水平的相对值分别为:ApoE4组(1.819±0.130,$P<0.01$,$n=3$)和ApoE3组(1.336±0.130,$P<0.01$,$n=3$),差异具显著差异,且ApoE4和ApoE3组比较也具有显著性差异($P<0.01$)。同样,相对于对照组,ApoE4和ApoE3组的磷酸化Tau蛋白(p-Tau)的相对值分别为1.587±0.027($P<0.01$,$n=3$)和1.436±0.026($P<0.01$,$n=3$),均具显著差异;且ApoE4组较ApoE3组的促进作用更强,两组间具显著差异($P<0.01$)。此外,用ApoE-siRNA干扰后,U87细胞中GSK-3β的表达和p-Tau水平均较对照组显著降低,分别为0.544±0.058($P<0.001$,$n=3$)和0.474±0.060($P<0.01$,$n=3$)。**结论** AD危险因子ApoE4可能通过上调GSK-3β的表达而促进Tau的磷酸化。
关键词:载脂蛋白E;阿尔茨海默病(AD);Tau蛋白;糖原合酶激酶3β

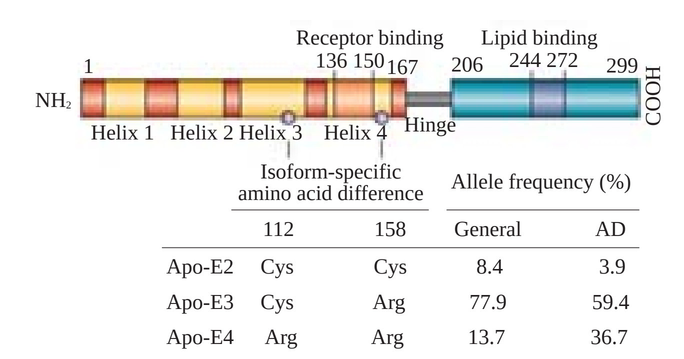
ApoE4 increases glycogen synthase kinase 3β expression and Tau phosphorylation in U87 cells

HE Yanjie[1,2], WEI Peiru[3], WU Qiaoyan[1], ZHANG Xinyu[3], ZHANG Xingmei[1], LIU Xiaojia[2], WANG Fang[1]
Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences[1], Department of Neurology, Nanfang Hospital[2], First College of Clinical Medicine[3], Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the relations among apolipoprotein E4, Tau protein and glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β). **Methods** U87 cells were transfected with pIRES-EGFP (control) or the recombinant plasmids ApoE4/pIRES-EGFP or ApoE3/pIRES-EGFP, and the expression levels of p-Tau/Tau and GSK-3β in the cells were examined with Western blotting. To further confirm the effect of ApoE on GSK-3β and p-Tau expressions, a short interfering RNA (siRNA) targeting ApoE (ApoE-siRNA) was transfected into U87 cells via Lipofectamine 2000 and the protein expressions were examined 24 h later. **Results** Compared with those in the control group, the expressions levels of both GSK-3β and p-Tau/Tau increased significantly in the cells transfected with ApoE4 and ApoE3 plasmids ($P<0.01$), and the ApoE4 plasmid produced a more potent effect than the ApoE3 plasmid on the protein expressions ($P<0.01$). ApoE knockdown resulted in significantly reduced expressions of GSK-3β ($P<0.001$) and p-Tau ($P<0.01$) in the cells. **Conclusion** ApoE4 can enhance Tau phosphorylation though upregulating GSK-3β, which sheds light on a new role of ApoE4 in Alzheimer's disease.
Key words: ApoE; Alzheimer's disease; Tau; glycogen synthase kinase 3β

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种渐进性神经退行性病变,目前其病因还不完全明了。其致病因素与多种基因相关[1],其中ApoE4(载脂蛋白E,第4亚型)是较为公认的AD危险因子,与散发型AD(sporadic AD, SAD)相关,而散发型AD约占临床AD总病例的95%[2]。因此,研究ApoE4在AD病症中的作用机制具有重要意义。人类ApoE蛋白有3种亚型,ApoE2、ApoE3和ApoE4,均由299个氨基酸组成[3]。它们之间的差别仅在于第112位和158位氨基酸的不同,且ApoE2与ApoE3及ApoE3与ApoE4之间仅有一个氨基酸的不同(图1)。由上述氨基酸组成的不同就造成了空间构像和功能上的差异[4]。与携带ApoE2和E3基因的个体相比,携带单拷贝或双拷贝ApoE4基因的个体患AD的危险性分别增加4倍和12倍[5]。

收稿日期:2016-04-06
基金项目:国家自然科学基金(81471388);广东省自然科学基金(2015A030313235);广州市科技计划项目(2014J4100148);教育部大学生创新创业训练计划项目(201312121020)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81471388).
作者简介:何颜结,在读硕士研究生,E-mail: 381980753@qq.com;卫佩如,本科,E-mail: 1163979744@qq.com。何颜结、卫佩如共同为第一作者
通信作者:王 方,博士,教授,E-mail: fwang@smu.edu.cn;刘晓加,教授,主任医师,E-mail: xiaojialiu07@126.com



	Isoform-specific amino acid difference		Allele frequency (%)	
	112	158	General	AD
Apo-E2	Cys	Cys	8.4	3.9
Apo-E3	Cys	Arg	77.9	59.4
Apo-E4	Arg	Arg	13.7	36.7

图1 ApoE不同亚型在112和158位氨基酸的区别

Fig.1 ApoE2, E3, and E4 isoforms differ from one another at amino acid residues 112 and/or 158 (grey circles).

淀粉样斑块(amyloid plaques, AP)及神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)是AD的特征性病变。其中,NFT是位于神经元胞内由Tau蛋白超磷酸化后聚集而成[6]。而Tau蛋白被异常(超)磷酸化后可使胞内微管稳定性降低,使神经元内的运输和通讯功能受损,最终导致细胞死亡[7]。研究证明,糖原合成酶激酶3β(glycogen synthase kinase 3β, GSK-3β)与Tau的超磷酸化密切相关[8-9],其异常表达与AD相关。

对ApoE4在AD中作用机制的研究,目前主要分为两类,一是Aβ依赖性病理机制[10-11],即:ApoE可以亚型依赖形式促进Aβ斑的形成(ApoE4>ApoE3>ApoE2)。同样ApoE的脂质复合体也能以亚型依赖形式清除Aβ来减少Aβ斑(ApoE2>ApoE3>>ApoE4)。另一条途径是Aβ非依赖性病理机制[12-13],即:ApoE4可在神经元内被蛋白酶切割,产生去除C-末端的片段[ApoE4(1-272)],该片段具有神经元毒性可通过损害线粒体及突触再生功能而产生AD病症[14]。ApoE4是否可影响Tau的磷酸化,目前还未见报道。

1 材料和方法

1.1 细胞株及主要试剂

U87脑星形胶质瘤细胞系购自于南京凯基生物公司。胎牛血清(FBS)、DMEM高糖培养基及0.25%胰蛋白酶均为Gibco公司产品。pIRES-EGFP表达质粒(Clonetech公司),重组质粒ApoE4/pIRES-EGFP和ApoE3/pIRES-EGFP为本研究组构建,高纯度质粒提取试剂盒(上海生工生物公司),ApoE-siRNA(正向:GCUGGGUGCAGACACUGUCUGAGCA及反向:UGCUCAGACAGUGUCUGCACCCAGC)和对照siRNA均由美国Invitrogen公司合成。细胞转染脂质体Lipofectamine 2000(Invitrogen公司),兔抗人p-Tau抗体(CST公司,Cat no. 11834S),兔抗人GSK-3β抗体(Cat no. BA0906-1)及羊抗兔IgG-HRP(二抗)均购自武汉博士德公司。显色剂ECL(Perkin-Elmer公司)。

1.2 ApoE的过表达实验

U87细胞混悬于2 mL/孔的DMEM高糖培养基中(含1% P/S(双抗)和10% FBS),在6孔培养板中,于37 ℃,5% CO_2培养至细胞密度达70%~80%时进行质粒转染。

分别将ApoE4/pIRES-EGFP、ApoE3/pIRES-EGFP及空白对照质粒(pIRES-EGFP)与脂质体Lipofectamine 2000混合(1 μg:2 μL)后转染U87细胞。为了建立ApoE过表达的细胞平台,U87神经胶质细胞瘤细胞被分为3个转染组:第1组为对照质粒pIRES- EGFP载体(即空白质粒,图2A),第2组是ApoE3/pIRES- EGFP重组质粒(即ApoE3过表达组,图2B),第3组是ApoE4/pIRES-EGFP重组质粒(即ApoE4过表达组,图2C)。然后于荧光显微镜下观察被转染细胞的绿色荧光。最后提取各组总蛋白用于下一步实验。

1.3 细胞总蛋白的提取

于上述细胞转染24 h后弃培养液,用预冷的PBS洗涤2次,吸净PBS后加入RIPA裂解液,在冰浴上孵育20 min后充分刮取贴壁细胞后转移至离心管中,于12 000 r/min,4 ℃下离心15 min,取上清总蛋白于新离心管中。应用Bradford法进行蛋白定量,备用。

1.4 Western blotting(蛋白免疫印迹)实验

上述蛋白样品经SDS-PAGE电泳后,将胶中蛋白转移至PVDF膜上并在室温下用5%脱脂奶粉封闭液封闭1 h,TBST(20 mmoL Tris·Cl,150 mmoL NaCl,0.1% Tween-20,pH7.4)洗涤2次,然后分别加入适当的一抗于含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中室温孵育1 h:兔抗人GSK-3β抗体按1:400稀释;兔抗人p-Tau抗体按1:800稀释。接着用TBST洗涤3次,然后用羊抗兔IgG-HRP(二抗,1:5000)于室温中再孵育1 h,TBST洗涤3次。最后将吸干水分的PVDF膜置于BioRad荧光成像仪的托板上,在膜上均匀加上ECL化学发光液并进行自动曝光拍照。选取曝光适当的照片进行分析。

1.5 ApoE-siRNA干扰实验

将U87细胞培养至密度达70%~80%(见1.2.1),用脂质体Lipofectamine 2000分别与双链ApoE-siRNA及对照siRNA混匀,室温放置15 min。而后加入U87细胞内,使siRNA的终浓度为150 nmol/L继续孵育24 h后提取实验组和对照组的细胞总蛋白。最后用Western blotting法检测相应蛋白的含量(见1.4)并进行统计学对比。

1.6 统计学分析

应用SPSS 18.0软件处理至少3次独立实验的数据,以平均数±标准差表示。两两比较采用两独立样本 *t*

检验;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。P<0.05认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ApoE4和ApoE3表达质粒转染U87细胞的荧光信号检测

在转染24 h后,于倒置荧光显微镜下检测绿色荧光蛋白EGFP的荧光信号,以判明转染质粒在细胞中的过表达情况。结果表明:ApoE4,ApoE3重组质粒及对照质粒均成功转染入宿主细胞并表达出非融合的EGFP指示蛋白。

2.2 ApoE4可上调GSK-3β表达及增加Tau的磷酸化

从2.1所转染的3组U87细胞中分别提取其总蛋白后利用Western blotting检测各实验组的GSK-3β、Tau蛋白的磷酸化水平(图3A)并进行统计学处理。结果显示,与对照组相比,GSK-3β蛋白水平的相对变化值分别为:ApoE4组(1.819±0.130,P<0.01,n=3)和ApoE3组(1.336±0.130,P<0.01,n=3),差异具有统计学意义;且ApoE4和ApoE3组间也有差异(P<0.01,图3B)。这一结果表明,ApoE4具有更强的上调GSK-3β作用。同时,与对照组相比,ApoE4和ApoE3使p-Tau蛋白变化的相对值分别为1.587±0.027(P<0.01,n=3)和1.436±0.026(P<0.01,n=3),差异均具有统计学意义;同样,ApoE4和ApoE3组间也有差异(P<0.01)。这一结果也表明,ApoE4较ApoE3有更强的增加Tau蛋白磷酸化水平的作用(图3C)。有趣的是为何ApoE3也可使Tau相关的该激酶表达上调及Tau磷酸化水平的增加。

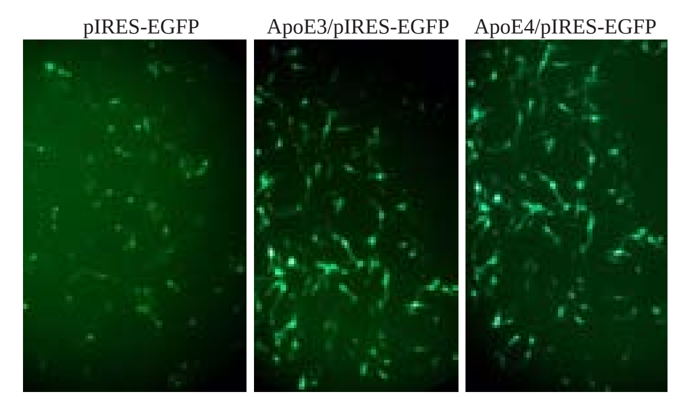


图2 不同EGFP非融合重组质粒转染U87细胞的绿色荧光图像

Fig.2 Expression of non-fused EGFP in U87 cells 24 after transfection with ApoE4, ApoE3 and pIRES-EGFP vector plasmids detected under the inverted fluorescent microscope (Original magnification: ×20).

2.3 ApoE-siRNA干扰可降低GSK-3β的表达及Tau蛋白的磷酸化

为进一步验证GSK-3β与Tau蛋白磷酸化水平与ApoE相关,我们将干扰ApoE表达的siRNA(ApoE-siRNA)转染至U87细胞,24 h后提取总蛋白并利用Western blotting检测对照组和干扰组的GSK-3β表达和Tau蛋白磷酸化的变化(图4A)。结果表明,干扰组的GSK-3β的表达与对照组相比明显降低(0.544±0.058,P<0.001,n=3,图4B)。同样,siRNA干扰后磷酸化Tau蛋白的相对变化值与对照组相比也明显降低(0.474±0.060,P<0.01,n=3,图4C)。这些结果进一步表明ApoE过表达可使GSK-3β水平升高且可增加Tau蛋白

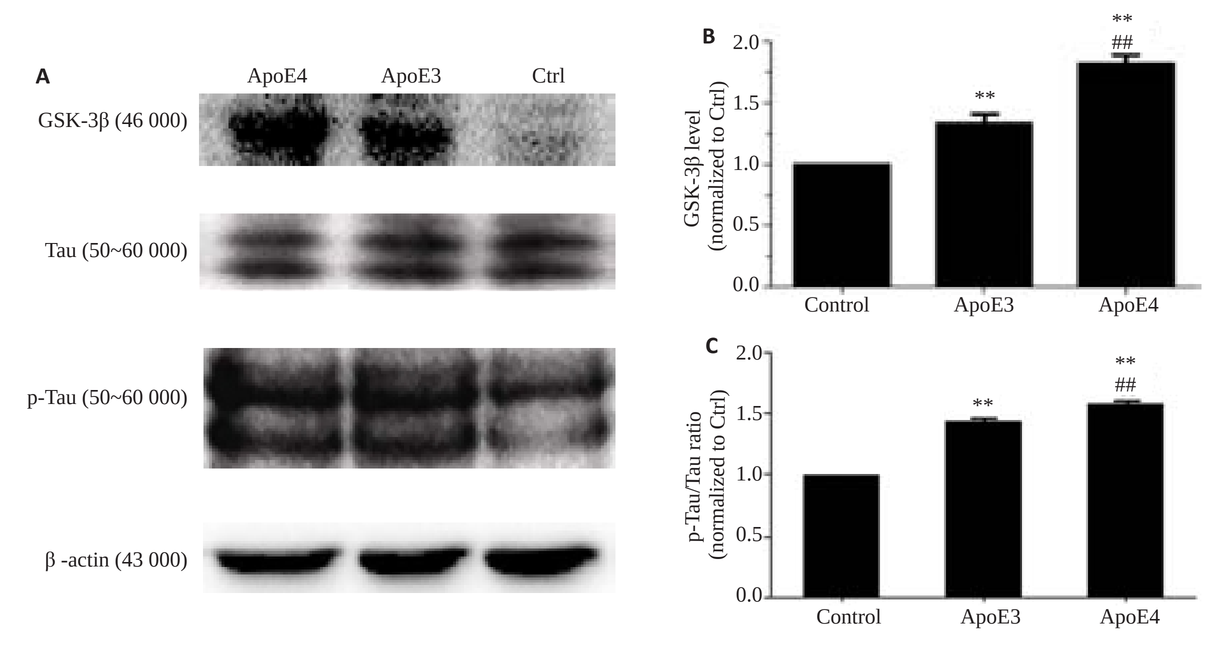


图3 ApoE4和ApoE3对GSK-3β水平及Tau磷酸化的影响

Fig.3 Both ApoE4 and ApoE3, especially the former, upregulate the expression of GSK-3β and enhance the phosphorylation levels of Tau. **P<0.01 vs control group, ##P<0.01 vs ApoE3 group.

的磷酸化水平。

本研究的结果显示：ApoE4的表达量与GSK-3β的表达及Tau蛋白的磷酸化水平成正相关。提示ApoE4在AD中的作用机制之一可能是通过上调GSK-3β而使Tau蛋白的磷酸化水平上升以导致AD病症。对ApoE4在AD中的作用机制提出了新的解释。

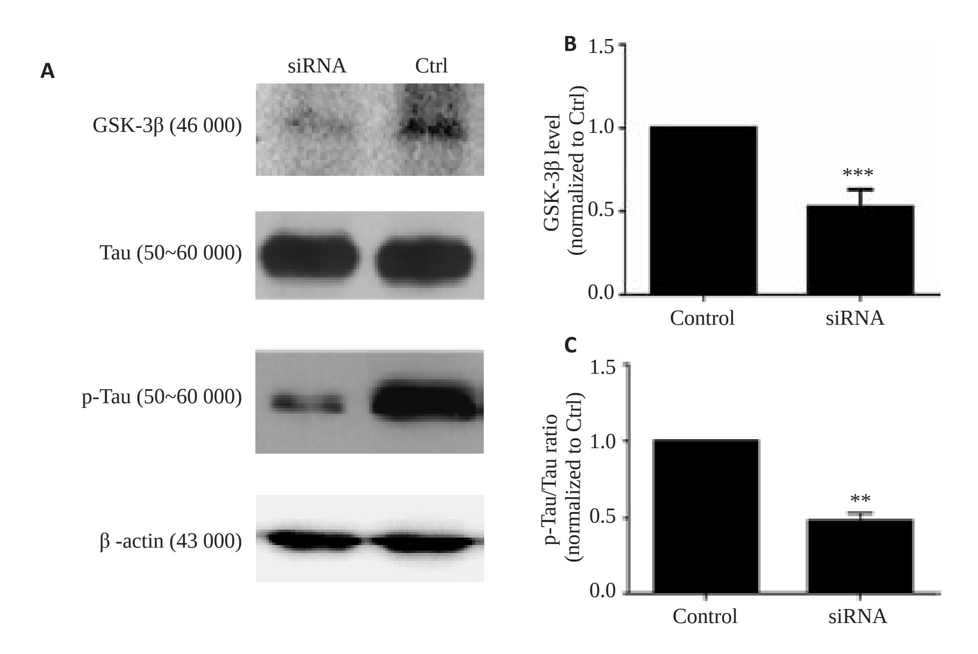


图4 ApoE-siRNA对GSK-3β及Tau蛋白的磷酸化水平的影响

Fig.4 ApoE-siRNA down-regulates the expression of GSK-3β and decreases the phosphorylation of Tau. ****P*<0.001 and ***P*<0.01 *vs* control group.

3 讨论

AD是一种多因素引起的中枢神经退行性疾病，我国现有AD病患者达350多万，65岁以上老年人总患病率为5.9%，与西方国家资料接近[15]。至今AD的发病机制尚未完全明了，目前主要有：淀粉样多肽(Aβ)致病说[16]、Tau蛋白超磷酸化致病说[7]和遗传变异致病说[17]，等。在ApoE不同亚型的遗传背景因素中，ApoE4亚型被认为是AD病的危险因子[18]而ApoE3和ApoE2亚型不是。研究表明，GSK-3β是Tau磷酸化的主要激酶之一[8, 19]，而异常磷酸化的Tau可导致神经元功能的减退甚至死亡。从而认为GSK-3β可通过使Tau超磷酸化促进AD的病程进展。但ApoE4与GSK-3β间的相互关系还未见报道。

在正常情况下ApoE在脑中主要由星形胶质细胞表达，而目前所使用的人神经源性细胞系（如M-17，SH-SY5Y等）在正常情况下ApoE的表达水平很低（只有当受某些应激刺激或受损伤时才表达ApoE）[3, 5]。表明在脑星形胶质细胞中存在特有的ApoE基因调控系统。因此，我们在实验中采用U87人脑星形胶质细胞源性细胞系进行研究。拟通过在U87细胞中表达ApoE4和ApoE3来探讨它们在信号转导和功能上的差异。

本研究发现，在U87细胞中过表达ApoE4或ApoE3均使得GSK-3β的表达上调及增高Tau蛋白的磷酸化水平。而当用ApoE的抑制性siRNA处理后GSK- 3β的表达及Tau蛋白的磷酸化水平(p-Tau)均显著下降。值得注意的是：ApoE4过表达组与ApoE3过表达组之间存在着显著差异(*P*<0.01)，即如果将ApoE3(组)作为对照则ApoE4(组)仍具有显著上调GSK-3β表达和增高p-Tau水平的作用。这可能是ApoE4作为AD危险因子的作用之一。对于ApoE3在本实验系统中也可上调GSK-3β表达的现象，我们认为ApoE3的过表达使细胞内质网中未折叠蛋白增多而通过其感应分子IRE1（inositol-requiring enzyme 1，肌醇依赖酶1）产生内质网应激反应（ER stress），即未折叠蛋白反应（unfolded protein response，UPR）。从而导致NF-kb转录因子表达增高[20-21]继而引起GSK-3β的表达上调。采用转录因子结合序列的分析发现(http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) ，在GSK- 3β基因的启动子[22]中存在NF-kb的转录结合位点。而ApoE4较ApoE3具更为显著的上述作用则是源于它们分子间在空间构象上的差异[3]。基于上述资料和分析，本研究的结果表明ApoE4可能通过上调GSK-3β的表达而增强Tau的磷酸化并以此促进AD病程的发展，为探索ApoE4在AD中的作用机制提供了新

的实验依据。

参考文献:

[1] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2011, 377(9770): 1019-31.
[2] Sadigh-Eteghad S, Talebi M, Farhoudi M. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with sporadic late onset Alzheimer's disease. A meta-analysis[J]. Neurosciences, 2012, 17 (4): 321-6.
[3] Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, et al. Apolipoprotein E and alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy[J]. Nat Rev Neurol, 2013, 9 (2): 106-18.
[4] Zhong N, Weisgraber KH. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure [J]. J Biol Chem, 2009, 284(10): 6027-31.
[5] Kim J. Basak JM, holtzman DM. The role of apolipoprotein E in alzheimer's disease[J]. Neuron, 2009, 63(3): 287-303.
[6] Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P, et al. Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital[J]. Cereb Cortex, 1994, 4(2): 138-50.
[7] Khan SS, Bloom GS. Tau: the center of a signaling nexus in alzheimer's disease[J]. Front Neurosci, 2016, 10(1/5): 31.
[8] Rankin Ca SQ, Gamblin TC. Tau phosphorylation by GSK-3β promotes tangle-like filament morphology[J]. Mol Neurodegener, 2007, 2: 12.
[9] Billingsley ML, Kincaid RL. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration [J]. Biochem J, 1997, 323(Pt 3): 577-91.
[10] Castellano JM, Kim J, Stewart FR, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-β peptide clearance[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(89): 89ra57
[11] Jungsu Kim JM, David M. Holtzman. The role of apolipoprotein E in alzheimer's disease[J]. Neuron, 2009, 63(3): 287-303.
[12] Huang Y. Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Trends Mol Med, 2010, 16 (6): 287-94.
[13] Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, et al. Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(19): 10966-71.
[14] Brecht WJ, Harris FM, Chang S, et al. Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice[J]. J Neurosci, 2004, 24(10): 2527-34.
[15] 王华丽, 于欣. 中国阿尔茨海默病的流行病学现状[J]. 中华全科医师杂志, 2006, 5(6): 358-60.
[16] Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease[J]. Trends Pharmacol Sci, 1991, 12 (10): 383-8.
[17] Bertram L, Lill CM, Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease: back to the future[J]. Neuron, 2010, 68(2): 270-81.
[18] Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(5): 1977-81.
[19] Llorens-Martín M, Fuster-Matanzo A, Teixeira CM, et al. GSK-3β overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons *in vivo*[J]. Mol Psychiatry, 2013, 18(4): 451-60.
[20] Gotoh T, Endo M, Oike Y. Endoplasmic reticulum stress-related inflammation and cardiovascular diseases[J]. Int J Inflam, 2011; 2011: 259462.
[21] Steinbrecher KA, Wilson W, Cogswell PC, et al. Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(19): 8444-55.
[22] Lau KF, Miller CC, Anderton BH, et al. Molecular cloning and characterization of the human glycogen synthase kinase-3beta promoter[J]. Genomics, 1999, 60(2): 121-8.

(编辑:经 媛)